Journal of Horticultural Science
Vol. 35, No.2, Summer 2021, P. 209-221
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰، ص. ۲۲۱-۲۰۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

مقاله پژوهشی

مقایسه درصد و اجزای اسانس دو ژنوتیپ ریحان افریقایی (*Ocimum gratissimum* L.) در دو فصل بهار و پائیز

فرنوش ملکشاهی[۱]- علی اشرف مهرابی[۲*]- الهه توکل[۳]- خسرو مهدی خانلو[٤]- وحید شریعتی جونی[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۷

چکیده

ژنتیک گیاه دارای نقش مهم در تعیین نوع و میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی می‌باشد و بر همین اساس همواره شناخت گونه‌ها و ارقام دارای توانمندی ژنتیکی بالا در تولید متابولیت‌های دلخواه در صدر برنامه‌های اصلاحی گیاهان دارویی قرار دارد. تحقیق حاضر با هدف بررسی تغییرات پروفایل شیمیایی اسانس دو ژنوتیپ با کد بذر ۲۷۸ و ۲۹۶ گیاه ریحان گونه گراتیسیموم (*Ocimum gratissimum* L.) طی فصل‌های بهار و پائیز سال ۱۳۹۸، در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز در قالب طرح کرت های خرد شده در زمان انجام شد. بخش هوایی گیاهان در زمان‌های فوق در مرحله تمام گل برداشت و در سایه و دمای محیط خشک شدند. اسانس گیاهان خشک شده به روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر استخراج و کمیت و کیفیت اجزای اسانس گیاه با دستگاه GC-MS مورد آنالیز قرار گرفت. بر اساس نتایج آنالیز کیفی اسانس، ۵۰ ترکیب مختلف در اسانس ژنوتیپ‌های ۲۷۸ و ۲۹۶ گیاه دارویی ریحان گراتیسیموم شناسایی شد. بیش از ۹۸ درصد ترکیبات شناسایی شده در اسانس این دو ژنوتیپ در پنج کلاس شیمیایی شامل مونوترپن‌های هیدروکربنه و اکسیژن‌دار و سزکوئی‌ترپن‌های هیدروکربنه و اکسیژن‌دار و فنیل پروپانوئیدها قرار داشتند. تیمول جزء غالب اسانس ژنوتیپ ۲۷۸ در ماه‌های خرداد (۳۵/۴۸ درصد) و آبان (۴۵/۸۵ درصد) بود، ترکیب گاما ترپینن در ژنوتیپ ۲۷۸ از ۱۳/۱۵ درصد در خرداد ماه به ۲۵/۸۰ درصد در آبان ماه، افزایش یافت. تیمول در اسانس ژنوتیپ ۲۹۶ وجود نداشت و ترکیب دی‌هیدرواوژنول که به کلاس شیمیایی فنیل پروپانوئیدها تعلق دارد، به عنوان ترکیب اصلی اسانس ژنوتیپ ۲۹۶ گیاه ریحان گراتیسیموم شناخته شد و مقدار آن در دو برداشت تغییر معنی‌داری نداشت. در مجموع، با توجه به اجزای اصلی اسانس دو ژنوتیپ و رشد مناسب آن‌ها بصورت چندساله و امکان چندین برداشت در طول سال، تحقیقات بیشتر جهت کشت آنها در سطح وسیع در شرایط استان خوزستان توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، اوژنول، تیمول، ریحان، ژنوتیپ

مقدمه

خانواده نعناع یکی از بزرگترین خانواده‌های گیاهی محسوب می شود و با حدود ۲۰۰ جنس و ۳۲۰۰ گونه طیف وسیعی از گیاهان را در خود جای می‌دهد (۱۷). جنس اسیموم یکی از مهمترین جنس‌های خانواده نعناع بوده و یکی از ارزشمندترین گیاهان دارویی جهان به شمار می‌آید. گیاهان این جنس، بومی مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری آسیا، آفریقا، مرکز و جنوب آمریکا هستند و به صورت خودرو در این مناطق یافت می‌شوند (۳۰). وجود چندشکلی و سهولت دگرگرده‌افشانی در جنس ریحان، سبب ایجاد طیف گسترده‌ای از تنوع درونی و بین فردی، گونه‌ها، واریته‌ها و فرم‌های متعددی در آن شده است و به همین دلیل تنوع بالایی در گیاهان این جنس از نظر مورفولوژی و ترکیبات شیمیایی مشاهده می‌شود (۲۳). تعداد گونه‌های جنس ریحان بین ۳۰ تا ۱۵۰ گونه گزارش شده است که شامل گیاهان علفی، یکساله و چندساله می‌باشند و از نظر عادت رشد، رنگ

۱- دانشجوی دکتری گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام
۲- دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام و دانشیار پژوهش، بخش زیست فناوری، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و توسعه کشاورزی، تهران
(*- نویسنده مسئول: Email: a.mehrabi@rifr-ac.ir)
۳- دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۴- استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۵- استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری کرج

DOI: 10.22067/jhs.2021.61739.0

و ترکیبات معطر بسیار متفاوتند (۲۸).

گیاه ریحان دارای متابولیت‌های ثانویه ارزشمند و مهم در اندام‌های رویشی خود بوده و بر این اساس از دیرباز به عنوان اشتهاآور، داروی گیاهی ضدتشنج و ضدانگل شناخته شده است. علاوه بر این، این گیاه در طب سنتی در درمان بیماری‌هایی نظیر سردرد، سرفه، اسهال، ناراحتی‌های کلیوی و درمان برخی ناراحتی‌های قلبی نیز مورد استفاده فراوان بوده است (۱۹ و ۱۶). عصاره و اسانس گونه‌های مختلف گیاه ریحان، دارای خواص ضدباکتریایی، ضدویروسی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی برجسته‌ای است و امروزه به‌طور گسترده در صنایع داروسازی به کار می‌رود (۱۳ و ۱۱). علاوه بر صنایع داروسازی، از برگ‌های تازه و خشک ریحان به عنوان چاشنی و ادویه و از اسانس آن به عنوان طعم‌دهنده و عامل ایجاد عطر و رنگ در صنایع غذایی استفاده می‌گردد (۲۲). همچنین، گیاهان این جنس به دلیل خواص ضد میکروبی خود دارای کاربرد فراوان در صنایع آرایشی- بهداشتی بوده و در ساخت عطرها، صابون‌ها، خمیردندان‌ها و دهان‌شویه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۳).

مهمترین گونه‌های جنس اسیموم، *Ocimum gratissimum*، *O. basilicum*، *O. Killmandscharicum*، *O. minimum*، *O. selloi*، *O. americanum*، *O. citriodrum* Vis. و *O. lamiifolium* می‌باشند (۱۲). گونه *O. gratissimum* گیاهی علفی و یک‌ساله، با ارتفاع حدود ۱ تا ۳ متر و برگ‌هایی به رنگ سبز لیمویی می‌باشد که بطور گسترده در جنوب و مرکز آمریکا و نواحی غربی آسیا مانند کشور هند پراکنده است (۳۷). این گونه به دلیل دارا بودن ترکیبات فیتوشیمیایی ارزشمند از جمله گونه‌های مهم جنس ریحان به شمار می‌آید و در صنایع مختلف به ویژه صنعت داروسازی مورد توجه فراوان می‌باشد. علاوه بر آن، بطور سنتی به عنوان خلط‌آور، تب‌بُر، ملین و کرم‌کُش و بهبود دهنده سردرد، گلودرد و بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی مورد استفاده بوده است (۱۴ و ۷). این گونه حاوی ۰/۳۳ تا ۰/۹۳ درصد اسانس به‌ترتیب بر اساس وزن تر و خشک می‌باشد (۲۷). در بررسی دیگری که در دو منطقه نیجریه و سیرالئون صورت گرفت، دو واریته از گونه گراتیسیموم ارزیابی شده و درصد اسانس بر اساس وزن خشک، به ترتیب ۰/۸۴ و ۰/۹۳ گزارش گردید. اسانس این گیاه دارای فعالیت ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدعفونی و ضدانعقادی برجسته می‌باشد (۹ و ۳۱) که این ویژگی‌ها عمدتا به دلیل وجود ترکیب اوژنول (۵۳/۸۹ درصد) و در برخی واریته های دیگر آن تیمول (۴۲/۲ تا ۶۰/۵ درصد) است (۲ و ۳۷). ترکیبات اسانس با مقادیر متفاوتی از گونه گراتیسیموم بسته به محل جمع‌آوری (منشاء) و ژنوتیپ گزارش شده است. در یک بررسی که توسط لاورنس و همکاران (۲۰) انجام گردید، اجزای اسانس ژنوتیپ ۳۸۷؛ تیمول (۳۵/۴ درصد)، پی‌سیمن (۱۸/۳ درصد) و اوژنول (۱۰/۷ درصد)، و در ژنوتیپ 345C؛ تیمول (۴۶/۶ درصد) و گاما ترپینن (۲۲/۴ درصد)، در ناحیه جنوب غربی رواندا، و ژنوتیپ ۳۴۵ دارای تیمول (۴۶ درصد)، و ژنوتیپ ۳۸۷ حاوی تیمول (۳۵/۴) و اوژنول (۱۰/۷ درصد) از کشور ترکیه می‌باشند. اجزای اسانس در نواحی غربی کامرون، شامل تیمول (۴۶/۳ درصد)، گاماترپینن (۲۰درصد) و پی سیمن (۷ درصد) ذکر شده است (۱۸). اجزای غالب دیگر اسانس گونه گراتیسیموم کشت شده در کشور هند، ترکیبات سیس اُسیمن (۲۳/۹۷ درصد) و ژرماکرین دی (۱۰/۳۶ درصد) بودند (۲).

از آنجا که میزان و نوع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی از جمله گیاه ریحان از اهمیت ویژه‌ای در تعیین خواص درمانی آنها برخوردار است، همواره شناخت عوامل مؤثر بر کمیت و کیفیت این ترکیبات مورد توجه محققین مختلف بوده است. از جمله عوامل مؤثر بر میزان و اجزای انواع مختلف متابولیت‌های ثانویه در این گیاهان می‌توان به ژنتیک گیاه، عوامل فیزیولوژیکی، اندام گیاهی، نوع ساختار ترشحی، عوامل محیطی، شرایط خاکی، زمان و نحوه برداشت و انبارداری اشاره نمود (۱۰). اگرچه مناسب بودن شرایط اقلیمی و تغذیه کافی دارای اهمیت فراوان در رشد گیاه و تعیین کمیت و کیفیت این دسته از متابولیت‌ها در گیاهان دارویی می‌باشند اما عوامل مذکور به تنهایی جهت دستیابی به عملکرد بالای کمی و کیفی آنها کافی نیستند و ژنتیک گیاه نقش مهمی در تعیین نوع و میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی دارد. در واقع این صفات نیز همچون سایر صفات گیاه به توانایی ژنتیکی، نوع و میزان بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز آنها وابسته است و ژنوتیپی که در آن مسیرهای بیوشیمیایی تولید یک متابولیت خاص و پرکاربرد بیشترین فعالیت را دارد، حائز یک مدل ژنتیکی ارزشمند است. بر این اساس همواره شناخت گونه‌ها و ارقام دارای توانمندی ژنتیکی بالا در تولید متابولیت‌های دلخواه در صدر برنامه‌های اصلاحی گیاهان دارویی قرار داشته و توجهات فراوانی را به خود جلب کرده است. تاکنون مطالعات متعددی بر روی گونه‌ها و توده‌های مختلف گیاه ریحان صورت گرفته و نتایج آنها حاکی از وجود تفاوت‌های گسترده در میزان و اجزای اسانس و ترکیبات فنولی در میان گونه‌های مختلف این جنس است (۳۲، ۲، ۲۶، ۳۵ ،۱۶، ۳۶ و ۲۵). در پژوهشی، ۳۳ ترکیب در اسانس برگ‌های *O. gratissimum* L. شناسایی و ترکیبات اصلی اجزای اسانس آن شامل اوژنول (۴۳/۲ درصد)، ۱ و ۸ سینئول (۸/ ۱۲ درصد) و بتا سلینن (۹ درصد) بود (۵).

شرایط اقلیمی مهم‌ترین عامل مؤثر در رشد گیاهان محسوب می‌شود و تغییرات اقلیمی تأثیر شگرفی بر مؤلفه‌های رویشی و تولید اقتصادی ماده مؤثره گیاهان دارویی می‌گذارد. زمان برداشت گیاهان دارویی چه در طول روز و چه در مراحل فنولوژیکی مختلف نقش عمده‌ای در تغییر تولید ماده موثره گیاهان دارند و این امر به دلیل نوسان فعالیت‌های متابولیکی گیاه تحت تاثیر عوامل مختلف محیطی در طول رشد گیاه می‌باشد (۲۱). در پژوهشی، گونه‌های متعدد جنس

اسیموم در فصول مختلف برداشت و نتایج نشان داد که مقدار و ترکیب اسانس به‌دست آمده از گونه‌های مختلف اسیموم، با توجه به منطقه جغرافیایی، مرحله رشدی و فصل برداشت، متفاوت بود. در تحقیق مذکور، درصد اسانس بر اساس وزن تر از ۰/۷۷-۰/۱۸ در فصل برداشت (آوریل- مـی) و ۰/۷۴-۰/۱۴ درصد در فصل برداشت(اکتبر- نوامبر) متفاوت بود (۳۴). علاوه بر میزان اسانس، ترکیبات عمده آن نیز در کموتایپ‌های مختلف از نواحی مختلف، با توجه به شرایط آب و هوایی، فصل و شرایط خاک متغیر است (۱۵).

اخیرا ژنوتیپ‌هایی از گونه گراتیسیموم از کشور آلمان وارد و به صورت آزمایشی در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهید چمران کشت شده است. نکته قابل توجه در مورد گونه گراتیسیموم، رشد گیاه بصورت چندساله است که می‌تواند گرمای طاقت فرسای تابستان اهواز و سرمای نزدیک به صفر در دی ماه را تحمل نمایند. طبق بررسی‌های به عمل آمده، تاکنون گزارشی از پروفایل شیمیایی اسانس گونه گراتیسیموم در ایران وجود ندارد. بنابراین تحقیق حاضر با هدف بررسی مقدار و اجزای اسانس دو ژنوتیپ با رایحه کاملا متفاوت در دو فصل رشدی بهار و پاییز طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز واقع در حاشیه غربی رودخانه کارون با محدوده جغرافیایی ۳۱ درجه و ۲۰ دقیقه عرض شمالی و ۴۸ درجه و ۴۰ دقیقه طول شرقی و با ارتفاع ۲۲/۵ متر از سطح دریا طی سال زراعی ۹۷ صورت گرفت. ژنوتیپ‌های مورد نظر گیاه ریحان گونه گراتیسیموم (*Ocimum gratissimum* L.) شامل ۲۷۸ و ۲۹۶ بودند. بذر ژنوتیپ‌های مذکور از بانک بذر در آلمان تهیه و در اول اسفندماه ۱۳۹۷ در سینی نشاء حاوی بستر کوکوپیت و پرلیت کشت شدند. قوه نامیه بذرها ۸۰ درصد بود و با توجه به کشت سه عدد بذر در هر خانه سینی، تعداد گیاهچه کافی به مرحله انتقال به مزرعه رسید. پس از رسیدن گیاهان به مرحله مناسب (مرحله ۶ تا ۸ برگ حقیقی)، نشاء ها در ۱۰ فروردین ۱۳۹۸ در کرت هایی با ابعاد ۲ × ۲ متر، با فاصله ۴۰ سانتی‌متر بین دو بوته و ۴۰ سانتی‌متر بین ردیف، کشت شدند. عملیات داشت شامل آبیاری به‌صورت نشتی و بر اساس شرایط اقلیمی منطقه و نیاز گیاه صورت گرفت و کنترل علف هرز به‌صورت دستی انجام شد. قبل از شروع آزمایش و کاشت گیاه، نمونه مرکب از عمق ۰-۳۰ سانتی‌متری خاک، به‌طور تصادفی تهیه و برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن اندازه‌گیری شد (جدول ۱). سرشاخه‌های ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شامل برگ و گل در مرحله گلدهی کامل (تمام گل) در دو فصل بهار ۱۳۹۸ (۲۰ خرداد، ۷۰ روز پس از کاشت در مزرعه) و پائیز ۱۳۹۸ (۲۰ آبان، ۲۲۰ روز پس از کاشت در مزرعه) برداشت و در دمای محیط (دمای ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد) و سایه خشک شدند.

آزمایش بصورت کرت‌های خرد شده در زمان در نظر گرفته شد. فاکتور اول ژنوتیپ (کرت اصلی) در دو سطح : کد بذرهای ۲۷۸ و ۲۹۶ و فاکتور زمان برداشت گیاه در چهار سطح: فصول بهار، تابستان، پائیز و زمستان بود. متاسفانه امکان برداشت گیاه طی فصل تابستان به دلیل گرما بیش از حد و عدم شرایط مناسب گیاه برای برداشت (برگ کم و عدم گلدهی) و فصل زمستان به دلیل سرمای دی ماه و مقدار کم برگ گیاه میسر نبود. بنابراین آنالیز داده های بدست آمده با نرم افزار MSTATC برای دو فصل و دو ژنوتیپ انجام شد.

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش (عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری)

Table 1- Physical and chemical properties of the soil (0-30 cm)

روی Zn	مس Cu	آهن Fe	پتاسیم قابل جذب Absorbale K	فسفر قابل جذب Absorbale P	نیتروژن کل Total N (%)	مواد آلی Organic matter (%)	هدایت الکتریکی EC ($dS.m^{-1}$)	pH	بافت خاک Soil texture
($mg.kg^{-1}$)									
10.90	3.36	23.1	267	16.6	0.03	0.48	2.84	7.11	شنی- لومی Loamy sand

جهت استحصال اسانس، مقدار ۵۰ گرم از پیکره رویشی به همراه ۱۳۰۰ میلی‌لیتر آب درون بالن‌های ۲ لیتری ریخته شده و اسانس گیاه به مدت ۳ ساعت با استفاده از دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب استخراج شد. اسانس‌های جمع‌آوری شده پس از توزین و آبگیری با سولفات سدیم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز کمی و کیفی ترکیبات شیمیایی نگهداری شدند. آنالیز کمّی و کیفی ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده اسانس به ترتیب توسط دستگاه‌های گاز کروماتوگرافی[1] و گازکروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی[2] با مشخصات زیر انجام شد.

بدین منظور از دستگاه گازکروماتوگرافی مدل Shimadzu -17A

1- Gas Chromatography (GC)

2- Gas Chromatography- Mass spectrometry (GC/MS)

مجهز به ستون موئینه SGE™BP5 (به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۳۲ میلی‌متر، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر) استفاده گردید. دمای اولیه ۶۰ درجه سانتی‌گراد (با زمان نگهداری ۱ دقیقه) بود که با ۵ درجه سانتی‌گراد افزایش در هر دقیقه به دمای نهایی ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد (با زمان نگهداری ۲ دقیقه) رسید. درجه حرارت محفظه تزریق و آشکارساز نیز به ترتیب ۲۸۰ و ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود. از گاز هلیم به عنوان گاز حامل استفاده شد که سرعت حرکت آن در طول ستون، ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود.

اندازه گیری ترکیبات اسانس با دستگاه GC/MS

جهت آنالیز کیفی اجزای اسانس از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی نوع Agilent مدل ۷۸۹۰ ستون HP-5 ms (به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر) استفاده شد. دمای اولیه ۶۰ درجه سانتی‌گراد (با زمان نگهداری ۱ دقیقه) بود که با ۵ درجه سانتی‌گراد افزایش در هر دقیقه به دمای نهایی ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد (با زمان نگهداری ۲ دقیقه) رسید. درجه حرارت محفظه تزریق و آشکارساز به ترتیب ۲۸۰ و ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود. در این دستگاه نیز از گاز هلیم به عنوان گاز حامل استفاده شد که سرعت حرکت آن در طول ستون، ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و زمان اسکن برابر ۱ ثانیه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت بود.

اسانس‌ها به دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌نگار جرمی تزریق گردید و طیف جرمی ترکیب‌های اسانس به‌دست آمد. شناسایی طیف‌ها به کمک بانک اطلاعات جرمی، زمان بازداری، مطالعه طیف‌های جرمی هر یک از اجزای اسانس و بررسی الگوهای شکست آن‌ها، مقایسه آن‌ها با طیف‌های استاندارد و با استفاده از منابع معتبر انجام شد (۱). علاوه بر آن، ان آلکان ها با شرایط مشابه آنالیز اسانس به دستگاه تزریق و شاخص کواتس برای هر کدام از ترکیبات اسانس با توجه به فرمول زیر محاسبه و شناسایی اجزای اسانس با مقایسه شاخص کواتس هر ترکیب و شاخص گزارش شده در منابع تایید گردید.

$$I= 100 \times [n + ((N - n) \times \frac{t_{r(unknown)} - t_{r(n)}}{t_{r(N)} - t_{r(n)}})]$$

در این فرمول، I[۱] = شاخص کواتس، n = عدد کربن در آلکان کوچک‌تر، N = عدد کربن در آلکان بزرگ‌تر، $t_{r\ (unknown)}$ = زمان ثبت ترکیب ناشناخته، $t_{r\ (N)}$ = زمان ثبت هیدروکربن با آلکان بزرگ‌تر و $t_{r\ (n)}$ = زمان ثبت هیدروکربن با آلکان کوچک‌تر می‌باشد.

1- Index Kovats

نتایج و بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان اسانس گونه گراتیسیموم بیشتر متاثر از ژنوتیپ می‌باشد و کمتر تحت تاثیر شرایط محیطی دو فصل مورد مطالعه قرار می‌گیرد (جدول ۲). میزان اسانس ژنوتیپ ۲۷۸ به ترتیب در فصل بهار و پاییز، ۰/۷۶ و ۰/۷۲ درصد و ژنوتیپ ۲۹۶ حدودا دو برابر ژنوتیپ ۲۷۸ اسانس داشت که به ترتیب فصل ۱/۴۱ و ۱/۴۹ درصد بود (جدول ۳). بر اساس نتایج آنالیز کیفی اسانس توسط دستگاه GC/MS، ۵۰ ترکیب مختلف در اسانس ژنوتیپ‌های ۲۷۸ و ۲۹۶ گیاه دارویی ریحان گراتیسیموم شناسایی شد (جدول ۱). کروماتوگرام دو نمونه در شکل ۱ نشان داده شده است. مونوترپن‌های هیدروکربنه و اکسیژن‌دار در مجموع حدود ۹۰ درصد ترکیبات اسانس استخراج شده از ژنوتیپ ۲۷۸ گیاه ریحان گراتیسیموم در ماه‌های خرداد و آبان را تشکیل داده و پس از آن، به ترتیب سزکوئی‌ترپن‌های هیدروکربنه و اکسیژن‌دار در رده‌های بعدی قرار داشتند. اجزای غالب اسانس این ژنوتیپ در ماه خرداد، تیمول (۳۵/۴۸ درصد)، گاما- ترپینن (۱۳/۱۵درصد)، پی- سیمن (۱۱/۳۱درصد)، آلفا- توژن (۴/۷۶ درصد)، ژرماکرین- دی (۳/۷۳ درصد)، کاریوفیلن (E) (۳/۶۶ درصد)، میرسن (۲/۹۳ درصد)،آلفا- ترپینن (۲/۶۳ درصد)، و بورنئول (۲/۲۸ درصد) بودند که حدود ۸۰ درصد ترکیبات شیمیایی اسانس این ژنوتیپ را تشکیل دادند (جدول ۴). ترکیبات تیمول (۴۵/۸۵ درصد) و گاما- ترپینن (۲۵/۸۰ درصد) ژنوتیپ ۲۷۸ در آبان ماه نسبت به خرداد ماه بیشتر بود، این در حالی است که ترکیب پی- سیمن (۳/۵۶ درصد)، کاهش چشمگیری نسبت به خرداد ماه داشته است. ترکیبات دیگر شامل آلفا- ترپینن (۳/۳۸ درصد)، میرسن (۳/۰۱ درصد)، آلفا- توژن (۲/۹۴ درصد)، ژرماکرین- دی (۲/۷۶ درصد) و کاریوفیلن (E) (۱/۵۱ درصد) نسبت به خردادماه تغییر محسوسی نداشت. ترکیب بتا- سلینن (۱/۱۱ درصد) و بورنئول(۰/۷۱ درصد) در پاییز بسیار اندک بود. در ژنوتیپ ۲۹۶ ریحان گراتیسیموم حدود ۸۰ درصد ترکیبات اسانس متعلق به کلاس شیمیایی فنیل پروپانوئیدی بود و اجزای اصلی اسانس آن به ترتیب در ماه‌های خرداد و آبان می‌توان به ۴ ترکیب دی‌هیدرواوژنول (به ترتیب ۸۱/۱۸ و۷۹/۲۰ درصد)، بتا- اسیمن (Z) (به ترتیب ۱۱/۸۹ و ۳/۴۰ درصد)، ژرماکرین- دی (به ترتیب ۳/۵۸ و ۲/۸۰ درصد) و کاریوفیلن (E) (به ترتیب ۰/۵۲و ۲/۶۸ درصد) اشاره نمود.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مقدار اسانس دو ژنوتیپ تحت تاثیر فصل برداشت قرار نمی‌گیرد ولی میزان آن در دو ژنوتیپ متفاوت بود (جدول ۲ و ۳). میزان اسانس گیاهان دارویی تحت تاثیر تعداد و اندازه اندام های ترشح کننده و ذخیره اسانس قرار می گیرد. عوامل محیطی با تاثیر بر دو عامل فوق باعث کاهش یا افزایش اسانس در گیاهان می شود. با این وجود، ژنوتیپ گیاه مهمترین عامل تعیین

کننده تعداد و اندازه کرک های ترشحی است. بنـابراین بـه نظـر مـی رسد که عوامل محیطی در آزمایش حاضر تاثیر چنـدانی بـر دو عامـل مهم فوق نداشته است و میزان اسـانس در هـر ژنوتیـپ در دو فصـل مورد مطالعه نسبتا یکسان بود. پروفایل اسـانس در دو ژنوتیـپ مـورد مطالعه کاملا متفاوت بود که با اجزای اسانس گزارش شـده در منـابع مختلف روی گونه گراتیسیموم مطابقت داشـت. بـر اسـاس تحقیقـات انجام شده، اوژنول و تیمول بـه عنـوان ترکیـب اصـلی اسـانس گیـاه ریحان گراتیسیموم ذکر شده است (۶).

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر ژنوتیپ و زمان برداشت بر میزان اسانس گیاه دارویی ریحان گراتیسیموم (*Ocimum gratissimum*)

Table 2- ANOVA for the effect of Genotype and Harvest time on Essential oil content of African basil (*Ocimum gratissimum*)

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of fredom	میانگین مربعات Mean Squares
تکرار Replication	9	0.003 ns
ژنوتیپ Genotype	1	5.034 *
تکرار × ژنوتیپ Replication × Genotype	9	0.002 ns
زمان برداشت Harvest time	1	0.005 ns
ژنوتیپ × زمان برداشت Genotype × Harvest time	1	0.033 **
تکرار × زمان برداشت Replication × Harvest time	9	0.003 ns
خطای آزمایشی Error	9	0.033

ns: عدم معنی‌داری، ** و *: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

ns: non-significant, ** and *: significany at 1% and 5% of probability level

جدول ۳- اثر متقابل ژنوتیپ × زمان برداشت بر میزان اسانس گیاه دارویی ریحان گراتیسیموم (*Ocimum gratissimum*)

Table 3- The interaction effect of Genotype ×Harvest time on Essential oil content of African basil (*Ocimum gratissimum*)

ژنوتیپ Genotype (Code)	زمان برداشت Harvest time	میزان اسانس Essential oil content (%)
278	بهار Spring	0.76 c
	پاییز Autumn	0.72 c
296	بهار Spring	1.41 b
	بهار Autumn	1.49 a

در یک بررسی که بر روی ۷ گونه از جنس ریحان انجام گردیـد، گونه[۱](*Ocimum gratissimum* L) (نژاد زمینی۱) با میزان اوژنول ۷۴/۳ و ۵۳/۴ درصد بـه ترتیـب در بـرگ‌هـا و گـل آذیـن در فصـل برداشـت (آوریـل- مـی) و مقـادیر ۸۹/۵ و ۶۴/۴۱ درصـد در فصـل برداشت (اکتبر- نوامبر) به عنوان یک منبـع غنـی از اوژنـول شـناخته شد، این گونه دارای محتوی اسانس ۰/۶۴ درصد بوده و بـا توجـه بـه مقدار بالای اوژنول در برگ‌ها، مـورد توجـه مـی‌باشـد. در حـالی کـه پروفایل اجزای اسانس گونه گراتیسیموم[۲] (نژاد زمینی۲) متفاوت بـود و دارای بیشترین مقدار متیل ایزو اوژنول بـا مقـادیر ۴۰/۲۶ و ۳۸/۰۷ درصد به ترتیب در برگ‌ها و گل آذین بود. همچنـین حـداکثر میـزان آلفا- توژن درنژاد زمینی۱ مشاهده گردید و هر دو گونه دارای ترکیـب سیس بتا- سیمن در برگ‌ها بودند. در پژوهش فوق، فصل برداشـت و

1- Land race1

2- Land race2

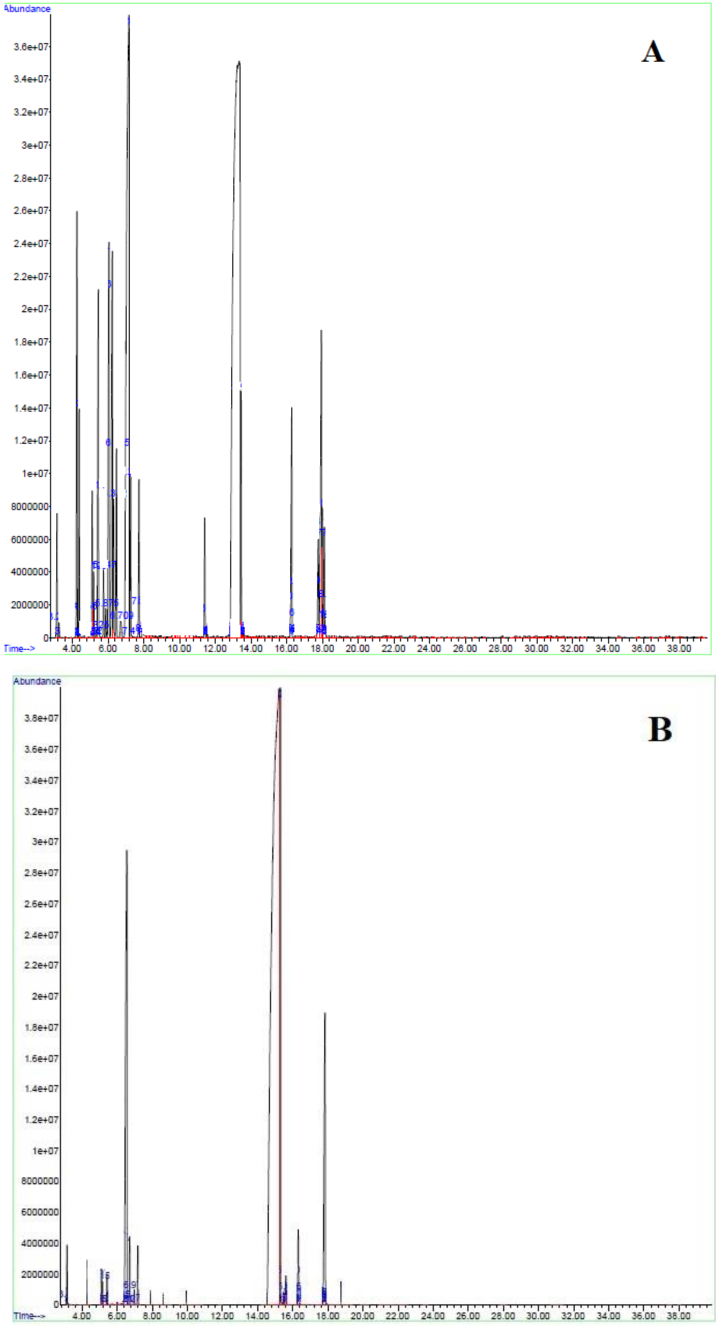
اندام گیاهی، بیشترین تاثیر را در تعیین زمان مناسب جهت حصول بیشترین مقادیر عملکرد اسانس و ترکیبات شیمیایی مناسب داشتند. به طوری که محتوی اسانس گل، حدود ۰/۴ درصد گزارش شد، در حالی که محتوی اسانس کل گیاه ۰/۲۵-۰/۱ درصد بود. همچنین عملکرد اسانس گل، ۱۳-۱۲ کیلوگرم در هکتار و عملکرد اسانس کل گیاه ۲۳-۱۸کیلوگرم در هکتار بود (۳۴). در مطالعه دیگری ۳۳ ترکیب به ترتیب در اسانس برگ‌های (*O. gratissimum* L.) شناسایی گردید. ترکیبات اصلی اجزای اسانس گونه گراتیسیموم شامل اوژنول (۴۳/۲ درصد)، ۱ و ۸ سینئول (۸/ ۱۲ درصد) و بتا سلینن (۹ درصد) بود (۵).

جدول ٤- ترکیبات اسانس ژنوتیپ‌های ۲۷۸ و ۲۹٦ گیاه دارویی ریحان گراتیسیموم (*Ocimum gratissimum* L.) در فصل بهار و پائیز

Table 4- Essential oil components of two genotypes of African basil (*Ocimum gratissimum* L.) at spring and fall seasons

ردیف No.	ترکیب Compounds	زمان بازداری Retention index	شاخص کواتس محاسبه شده Kovats index (calculated)	شاخص کواتس منابع Kovats index (reference)	O. g (278)-2	278	O. g (296)-2	296
					خرداد June	آبان October	خرداد June	آبان October
1	α -Thujene	4.89	920	924	4.76	2.94	0.18	0.36
2	α-Pinene	5.02	927	932	1.74	0.90	−	0.06
3	Camphene	5.30	942	946	0.23	0.09	−	−
4	Sabinene	5.76	966	969	0.63	0.63	0.35	0.42
5	β-Pinene	5.84	971	974	0.64	0.25	−	−
6	Myrcene	6.09	983	988	2.93	3.01	0.21	0.23
7	α-Phellandrene	6.40	1000	1002	0.26	0.36	−	−
8	δ-3-Carene	6.54	1006	1008	0.24	0.17	−	−
9	α-Terpinene	6.70	1012	1014	2.63	3.38	−	0.20
10	ρ-Cymene	6.88	1019	1020	11.31	3.56	−	0.23
11	Limonene	6.97	1023	1024	0.98	0.86	−	0.05
12	β -Ocimene (Z)	7.14	1030	1032	0.28	1.40	11.89	3.40
13	β-Ocimene (E)	7.40	1040	1044	0.12	0.20	0.45	0.12
14	γ -Terpinene	7.79	1056	1054	13.15	25.80	−	0.32
15	cis-Sabinene hydrate	7.91	1061	1065	0.76	1.86	0.40	0.36
16	Terpinolene	8.46	1084	1083	0.83	0.83	−	0.09
17	Linalool	8.69	1093	1095	1.17	029	0.10	0.35
18	2,5-Dimethyl styrene	9.05	1106	1099	−	0.16	−	−
19	Allo-Ocimene	9.48	1126	1128	−	−	0.17	0.19
20	1-allo-Terpineol	9.79	1131	1130	0.33	0.08	−	0.07
21	Isoborneol	10.53	1156	1155	0.62	0.12	−	−
22	Borneol	10.86	1167	1165	2.28	0.71	0.12	0.68
23	ρ Cymen-8-ol	11.16	1177	1179	0.53	0.13	−	0.07
24	α-Terpineol	11.24	1185	1186	0.26	−	−	0.21

25	Nerol	12.43	1224	1227	0.60	0.32	−	
26	Neral	12.63	1235	1234	0.06	−	−	
27	Geraniol	13.17	1246	1249	0.21	−	−	
28	Geranial	13.50	1274	1264	0.24	−	−	
29	Thymol	14.35	1295	1289	35.48	45.85	−	
30	Carvacrol	14.46	1299	1298	0.61	0.50	−	
31	Eugenol	15.96	1353	1356	0.17	0.08	−	0.10
32	Dihydro-Eugenol	16.44	1371	1366	−	−	81.18	79.20
33	α- Copaene	16.51	1372	1374	0.21	0.14	−	−
34	Geranyl acetate	16.66	1378	1379	−	−	0.33	0.85
35	β-Elemene	16.95	1388	1389	0.30	0.23	0.26	0.92
36	Methyl eugenol	17.62	1397	1403	−	0.11	−	−
37	Caryophyllene (E)	17.74	1417	1417	3.66	1.51	0.52	2.68
38	Trans- α-Bergamotene	18.12	1431	1432	0.07	0.22	−	0.16
39	α-Guaiene	18.22	1435	1437	0.29	0.08	−	−
40	α-Humulene	18.65	1451	1452	0.65	0.23	−	0.22
41	Germacrene D	19.55	1484	1484	0.73	2.76	3.58	2.80
42	β-Selinene	19.64	1488	1489	3.73	1.11	−	−
43	α-Selinene	20.03	1502	1498	1.31	0.16	−	0.18
44	δ -Cadinene	20.31	1514	1513	0.10	−	−	0.12
45	7-epi-α Selinene	20.36	1515	1520	0.18	0.08	−	−
46	γ-Cadinene	20.47	1520	1522	0.22	0.09	0.15	0.44
47	cis-Calamenene	20.73	1532	1528	0.08	−	−	0.05
48	Bicyclosesquiphellandrene	23.57	1646	1647	0.12	−	−	
49	α-Cadinol	23.80	1655	1652	0.25	−	−	
50	α-Bisabolol	24.58	1686	1685	0.16	−	−	0.59
	monoterpenes hydrocarbons				43.79	45.58	14.09	7.22
	monoterpenes oxygenated				41.23	47.71	0.12	1.02
	sesquiterpenes hydrocarbons				11.65	6.59	4.51	7.94
	sesquiterpenes oxygenated				0.41	−	−	1.18
	Phenylpropanoids				0.28	0.08	81.18	79.30
	Total				97.35	99.96	99.89	96.66



شکل ۱- کروماتوگرام ترکیبات شیمیایی اسانس ژنوتیپ های گیاه دارویی ریحان گراتیسیموم (*Ocimum gratissimum* L.). (A): ژنوتیپ ۲۷۸؛ (B): ژنوتیپ ۲۹٦

Figure 1- Chromatogram of the chemical composition oil of African basil (*Ocimum gratissimum* L.) genotypes. (A): Genotype 278; (B): Genotype 296

ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاهان دارویی بطور عمده محصول دو مسیر بیوسنتزی موالونیک اسید و شیکمیک اسید هستند. ترکیبات ترپنوئیدی همچون تیمول از طریق مسیر موالونیک اسید سنتز و ترکیبات فنیل پروپانوئیدی نظیر دی‌هیدرواوژنول و

اوژنول طی مسیر شیکمیک اسید ساخته می‌شوند. بنابراین با توجه به نتایج تحقیق حاضر به نظر می‌رسد مسیر تولید ترکیبات اسانس در ژنوتیپ ۲۷۸ از فنیل پروپانوئیدهایی نظیر اوژنول به سمت تولید ترکیبات مونوترپنی همچون تیمول سوق یافته است که این امر می‌تواند به دلیل افزایش بیان ژن آنزیم‌های مسیر موالونیک اسید باشد. در ژنوتیپ ۲۹۶ گیاه ریحان گراتیسیموم نیز افزایش میزان ترکیب دی‌هیدرواوژنول ممکن است ناشی از بیان بیشتر ژن آنزیم‌های مسیر تولید این ترکیب فنیل پروپانوئیدی نسبت به ترکیب اوژنول باشد. تحقیقات مختلف حاکی از بیان متفاوت ژن آنزیم‌های مسیرهای بیوسنتزی در مراحل رشدی و زمان‌های مختلف برداشت گیاه به عنوان یکی از مهمترین عوامل اثرگذار بر کمیت و کیفیت ترکیبات شیمیایی اسانس گیاهان دارویی می‌باشد (۳۴). ترکیباتی مانند پی- سیمن و گاما- ترپینن در ژنوتیپ ۲۷۸ در زمان‌های مختلف برداشت تغییر محسوسی داشتند که نشان دهنده تاثیر دما بر فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر سنتز اجزای اسانس در ژنوتیپ مورد مطالعه می‌باشد. برعکس به نظر می‌رسد که مقدار ترکیب دی هیدرواوژنول در ژنوتیپ ۲۷۸ در ماه‌های خرداد و آبان تحت تاثیر شرایط محیطی در دو فصل قرار نمی‌گیرد.

ترکیب تیمول یک مونوترپن اکسیژن‌دار مشتق شده از سیمن بوده و کارواکرول، ایزومر آن می‌باشد. گیاه آویشن (*Thymus vulgaris* L.) از خانواده نعناعیان، منبع اصلی تیمول به شمار می‌آید و میزان ترکیب فوق در این گیاه در دامنه ۱۰ تا ۶۴ درصد می‌باشد (۶). میزان این ترکیب در گونه (*Thymus broussonetii* Boiss.) گیاه آویشن، ۳۶/۷ درصد و در گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multifhora* Boiss.)، ۵۹ درصد ذکر شده‌اند (۸ و ۲۴). علاوه بر گیاه آویشن، منابع مختلف به میزان بالای این ترکیب در گونه‌های مختلف گیاه مرزه (*Satureja rechingeri* Jamzad**,** *Satureja bakhtiarica* Bonge **)** از خانواده نعناعیان، گیاه (*Trachyspermum copiticum* L.) از خانواده چتریان و گیاه (*Lippia multiflora* Molldenke) از خانواده شاه‌پسند اشاره دارند (۴ و ۲۹). در مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول، ترکیبات حدواسطی همچون ژرانیول پیروفسفات و سیتوکروم P450 اکسیداز دخیل هستند (۳۳) و با توجه به بالا بودن میزان این ترکیب در ژنوتیپ ۲۷۸ گونه گراتیسیموم گیاه ریحان به نظر می‌رسد آنزیم‌های مسیر بیوسنتز تیمول، بیان بالاتری داشته و می‌توان این گیاه را به عنوان یک ژنوتیپ دارای مقدار بالای ترکیب تیمول در جنس اسیموم گزارش نمود. با توجه به رشد و بیوماس مناسب ژنوتیپ ۲۷۸ و حداقل دو نوبت برداشت گیاه در هر سال و میزان اسانس و تیمول در سطح آویشن، شاید بتوان ژنوتیپ مذکور را در شرایط خوزستان که مناسب رشد آویشن نمی‌باشد، کشت نمود که مطمئنا توصیه مذکور نیازمند تحقیقات بیشتر می‌باشد.

علاوه بر ترکیب تیمول، رابطه مستقیم میان میزان بیان ژن اوژنول سنتاز و میزان ترکیب اوژنول به ویژه در برگ‌های جوان و گل‌آذین گونه‌های جنس اسیموم و همبستگی مثبت سطح رونویسی آنزیم کونیفریل الکل آلکیل ترانسفراز (مجموعه آنزیمی کلیدی در هدایت سوبسترا به سمت ترکیبات فنیل پروپانوئیدی) با فراوانی ترکیب کونیفریل الکل (ترکیب حدواسط کلیدی در مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئیدها)، حاکی از فعال بودن محصولات نهایی این مسیر بیوسنتزی جنس اسیموم می‌باشد (۳). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد ترکیب فنیل پروپانوئیدی دی‌هیدرواوژنول ترکیب غالب اسانس ژنوتیپ ۲۹۶ گیاه ریحان گراتیسیموم بود و به این ترتیب به نظر می‌رسد افزایش میزان ترکیب مذکور ممکن است ناشی از بیان بیشتر ژن آنزیم‌های مسیر تولید آن نسبت به اوژنول، ترکیب فنیل پروپانوئیدی دیگر، باشد. در این پژوهش، ترکیبات موجود در اسانس ریحان گراتیسیموم تحت تاثیر ژنوتیپ گیاه بوده و کمتر تحت تاثیر فصل برداشت (بهار-پاییز) قرار داشت.

غنچه گل گیاه میخک هندی (*Syzigium aromaticum* L.) یکی از منابع اصلی ترکیب اوژنول است که از زمان‌های قدیم در هند استفاده می‌شود. در ایران نیز گلچه‌های میخک برای تسکین درد دندان و به عنوان ادویه جهت معطر نمودن غذا و غیره مصرف می‌شود. کشت گیاه میخک با توجه به نیازهای خاص آب و هوایی و خاک به مناطق جنوبی هند و اندونزی محدود شده است و علی‌رغم سابقه کشت ۱۵۰ ساله در هند نیز سطح زیر کشت آن توسعه پیدا نکرده است. علاوه بر آن، گلدهی گیاه تحت شرایط مدیریت خوب در سال چهارم شروع و در سال پانزدهم به مرحله بلوغ و گلدهی کامل می‌رسد که از یک درخت ۱۵ تا ۲۰ ساله حدود ۳ تا ۴ کیلوگرم غنچه گل برداشت می‌شود. بنابراین علی‌رغم درصد اسانس و همچنین اوژنول بالا، محققین به دنبال گیاه جایگزین مناسبی برای میخک هستند و برخی از گونه‌های ریحان با توجه به دوره رشد کوتاهتر (۶۰ تا ۹۰ روز) و تعداد برداشت بیشتر در سال نسبت به میخک، توصیه شده است (۳۴). با توجه به شرایط آب و هوایی کشور ایران، تاکنون گزارشی از کشت تجاری میخک در ایران وجود ندارد و عمده میخک موجود در عطاری ها و مورد نیاز کارخانجات از کشورهای خارجی مثل هند و اندونزی تامین می‌شود. از طرفی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در شرایط خوزستان، ژنوتیپ ۲۹۶ حاوی مقدار مناسبی اسانس و دی هیدرواوژنول می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که تحقیقات بیشتری با هدف توسعه کشت گیاه در خوزستان و استان‌های جنوبی کشور انجام گردد.

نتیجه‌گیری

گونه گراتیسیموم (*Ocimum gratissimum* L.) بـه دلیـل دارا بودن ترکیبات فیتوشیمیایی ارزشمند از جمله گونه‌های مهـم جـنس ریحان به شمار می‌آید و اسانس و عصاره آن در صـنایع مختلـف بـه ویژه صنعت داروسازی مورد توجه فراوان است. نتایج تحقیق حاضـر نشان داد مقدار اسانس ژنوتیـپ ۲۹۶ تقریبـا دو برابـر ژنوتیـپ ۲۷۸ است که تحت تاثیر فصل برداشت قرار نمی‌گیرد. پروفایل شـیمیایی اسانس ژنوتیپ‌های ۲۷۸ و ۲۹۶ این گیاه دارویی شـامل ۵۰ ترکیـب مختلف متعلق به کلاس های شیمیایی مونوترپن‌های هیدروکربنـه و اکسیژن‌دار و سزکوئی‌ترپن‌های هیدروکربنـه و اکسـیژن‌دار و فنیـل پروپانوئیدی بود. ترکیب غالب اسانس ژنوتیپ ۲۷۸ شامل مونـوترپن اکسیژن‌دار تیمول بود. ترکیبات گاما- تـرپینن، پـی- سـیمن، آلفـا- ترپینن، میرسن، آلفا- توژن، ژرمـاکرین- دی، کـاریوفیلن (E) سـایز اجزای اصلی اسانس ایـن ژنوتیـپ بودنـد. ترکیـب دی‌هیـدرواوژنول ترکیب اصلی اسانس ژنوتیپ ۲۹۶ در ماه‌های خرداد و آبان شناسایی گردید و سایر ترکیبات اسانس آن شامل بتا- اسیمن (Z)، ژرماکرین- دی و کاریوفیلن (E) بود. فصل برداشت محصول روی اجزای اصـلی اسانس ژنوتیپ ۲۷۸ تاثیر داشـته اسـت در حالیکـه ترکیبـات اصـلی ژنوتیپ ۲۹۶ در دو فصل برداشت نسبتا ثابت بود. در مجموع، به نظر می‌رسد که دو ژنوتیپ مورد مطالعه در شـرایط اهـواز رشـد مناسـبی داشته و حاوی ترکیبات ارزشمند تیمول و اوژنول است که می‌تواند با اعمال روش های به زراعی چند برداشت در طول دوره رویش داشته باشد. با توجه به نیاز صـنایع مختلـف، پیشـنهاد مـی‌شـود تحقیقـات بیشتری جهت توسعه کشت آن در استان‌های جنـوبی کشـت انجـام شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از صندوق حمایـت از پژوهشـگران و فنـاوران (INSF) جهت حمایت مالی از طرح، دانشگاه ایلام و دانشگاه شـهید چمران اهواز جهت همکاری در این پـروژه تشـکر و قـدردانی مـی نمایند.

منابع

1- Adams R.P. 2007. Identification of essential Oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illiois.
2- Ananda A.K., Mohan M., Hiader S.Z., and Sharma A. 2011. Essential oil composition and antimicrobial activity of three *Ocimum* Species from uttarakhand (India). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 3: 223-225.
3- Anand A., Jayaramaiah R.H., Beedkar S.D., Jashi R.S., Mulani F.A., Dholakia B.B., PanekarS.A., Gad W.N., and Thulasivam H.V. 2016. Comparative fanctional characterization of eugenol synthase from four species: Implicatious on eugenol accumulation. Biochimica et Biophysica Acta 8: 1539-1547.
4- Bassole I.H., Lamien- Meda A., Bayala B., Tirogo S., Franz C., Novak J., and Dicko M.H. 2010. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha*× *Piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. Molecules 15(11): 7825- 7839.
5- Benitez N.P., Melendez Leon E.M., and Stashenko E.E. 2009. Eugenol and methyl eugenol chemotypes of essential oil of species *Ocimum gratissimum* L. and *Ocimum campechianum* Mill. From Colombia. Journal of Chromatographics Science 47: 800- 83.
6- Burt S. 2014. Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in foods: a review. International Journal of Food Mirobiology 94(3): 223- 253.
7- Cristiana M., Murbach F.M., Ortiz M., and Marques M.C. 2006. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacology 105: 161–166**.**
8- Elhabazi K., Aboufatima R., Bensalah A., Collado A., Sanz J., Zyad A., and Chait A. 2012. Acute toxicity of essential oils of two Moracan endemic species: *Thymus broussonetii* and *Thymus leptobotrys*. Moroccan Journal of Biology 8-9: 29-33.
9- Ezekwesili C.N., Obiora K.A., and Ugwu O.P. 2004. Evaluation of antidiarrhoeal property of crude aqueous extracts of *Ocimum gratissimum* in rats, Biokemistri 16: 122-131.
10- Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., and Scheffer J.J. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils, Flavour and Fragrance Journal 23: 213-226.
11- Gupta P., Yadav D.K., Siripurapu K.B., Palit G., and Maurya R. 2007. Constituents of *Ocimum sanctum* with antistress Activity. Journal of Natural Products 70: 1410-1416.
12- Hakkim F.L., Arivazhagan G., and Boopathy R. 2008. Antioxidant property of selected *Ocimum* species and their secondary metabolite content. Journal of Medicinal Plants Research 2(9): 250-257.
13- Hanif M.A., Al-Maskri A.Y., Al-Mahruqi Z.M.H., Al-Sabahi J.N., Al-Azkawi A., and. Al-Maskri M.Y. 2011. Analytical evolution of three wild growing Omani medicinal plants. Natural Product Communications 6: 1451-1454.

14- Janssen A.M., Scheffer J.J.C., Ntezurubanza L., and. Baerheim S.A. 1989. Antimicrobial activities of some *Ocimum* species grown in Rwanda. Journal of Ethnopharmacology 26: 57–63.
15- Jashi R.K., and Hoti S.L. 2014. Chemical composition of the essential oil of *Ocimum tenuiflorum* L. (Krishna Tulsi) from North West Karnataka, India.3: 99- 102. Available at http:// dx. doi. org/ 10.14719/pst.2014.1.3.52.
16- Javanmardi J., Khalighi A., Kashi A., Bais H.P., and Vivanco J.M. 2002**.** Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 5878-5883.
17- Kumars S. 2009. A Textbook of Plant Taxonomy. vol. 1. Compus Books International, New Delhi.
18- Kumar Pandey A., Singh P., and Tripathi N.N. 2014. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 4(9): 682-694.
19- Labra M., Miele M., Ledda B., Grassi F., Mazzei M., and Sala F. 2008. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotype of *Ocimum basilicum* L. cultivars. Plant Science 167: 725-731.
20- Lawrence B.M. 1985. A review of the world production of essential oil. Perfumer and Fiavorist 10: 2- 16.
21- Mahmoudi Sourestani., M. 2018. Essential oil quantity and quality of two of spearmint (*Mentha spicata* L.) in different harvesting times. Journal of Horticultural Science 31: 825-835.
22- Makri O., and Kintzios S. 2008. *Ocimum* sp. (basil): Botany, cultivation, pharmaceutical properties, and biotechnology. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants 13(3): 123-150
23- Marotti M., Piccaglia R., and Giovanelli E. 1996. Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. Journal of Agriculture and Food Chemistry 44: 3926-3929.
24- Misaghi A., and Basti A.A. 2007. Effects of *Zataria multiflora* Bioss. Essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATTC11778. Food Control 18(9): 1043-1049.
25- Moghadam M., Omidbaigi R., Salimi A., and Naghavi M.R. 2013. Morphological variation of native species of Basil (*Ocimum* spp.) In Iran. Iranian Journal of Horticultural Science 44: 227-243. (In Persian with English abstract)
26- Momani Monfared M., Mahmoodi Sourestani M., Zolfaghari M., and Malekzadeh M. 2018. Evaluation of quantitative and qualitative characteristics of essential oil of some Basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions in Ahvaz weather conditions. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 34(2): 286-297. (In Persian with English abstract)
27- Olugbade T.A., Ibranatu Kolipha-Kamara M., Christianah Abimbola Elusiyan CH., Osarugue Onawunmi Grace and Oguntuga Ogundaini A. 2017. Essential oil chemotypes of three *Ocimum* species found in Sierra Leone and Nigeria. Medicinal and Aromatic Plants 6: 2-6.
28- Omidbaigi R. 2007. Production and processing of medicinal plant. Vol 2 ed. 4. Astan Qudr Razavi Pub. Mashhad. (In Persian)
29- Oskuee R.K., Behravan J., and Ramezani M. 2011. Chemical composition, antimicrobial activity and antiviral activity of essential oil of *Carum copticum* from Iran. Avicenna Journal of Phytomedicine 1: 83–90.
30- Paton A., Harley R.M., and Harley M.M. 1999. *Ocimum*-an overview of relationships and classification. In: Holm, Y. and Hiltuen, R. (eds 1). Basil: The genus *Ocimum*. Hawood Academic, Amsterdam.
31- Rabelo M., Souza E.P., Soares P.M.G., Miranda A.V., Matos F.J.A., and Criddle D.N. 2003. Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) in mice. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 36: 521-524.
32- Saharkhiz M.J., Kamyab A.A., Kazerani N.K., Zomorodian K., Pakshir K., and Rahimi M.J. 2015. Chemical compositions and antimicrobial activities of *Ocimum sanctum* L. essential oils at different harvest stages. Jundishapur Journal of Microbiology 8: 1-7.
33- Salehi1 B., Prakash Mishra A., Shukla I., Sharifi-Rad M., del Mar Contreras M., Segura-Carretero A., |Fathi H., Nasri Nasrabadi N., Kobarfard F., and |Sharifi-Rad J. 2018. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses, Phytotherapy Research 1-19.
34- Smith G.R., and Tripathy V. 2016. Seasonal variation in the essential oils extracted from leaves and inflorescence of different *Ocimum* species grown in vestern plains of India. Industrial Crops and Products 94: 52-64.
35- Wesolowska A., Kosecka D., and Jadczak D. 2012. Essential oil composition of three sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. Experimental Papers 58: 5-16.
36- Zheljazkov V.D., Cantrell C.L., Evans W.B., Ebelhar M.W., and Coker C. 2008. Yield and composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum sanctum* L. grown at four locations. Hortscience 43: 737-741.
37- Zoghbi M.D.G.B., Oliveira J., Andrade E.H.A., Trigo J.R., Fonseca R.C.M., and Rocha A.E.S. 2007. Variation in volatiles of *Ocimum campechianum* Mill. and *Ocimum gratissimum* L. cultivated in the north of brazil. Journal of Essential Oil Bearing Plants 10: 229-240.

Journal of Horticultural Science
Vol. 35, No.2, Summer 2021, P. 209-221
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰، ص. ۲۲۱-۲۰۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

The Comparison of the Essential Oil Percentage Content and Composition of African Basil (*Ocimum gratissimum* L.) in Spring and Fall Harvests

F. Malekshahy[1]- A.A. Mehrabi[2*]- E. Tavakol[3]- Kh. Mehdi Khanlou[4]- V. Shariati Jouni[5]

Received: 22-01-2020
Accepted: 17-11-2020

Introduction: Basil genus (*Ocimum*) contains 30 to 150 species which grown in tropical and subtropical regions of Asia, Africa, Central and South America and found as a wild plant in these areas. In India, around 25,000 ha is under cultivation of *Ocimum* spp., with an annual production of about 250–300 tonnes of essential oil. *Ocimum gratissimum* L., a dicotyledonous shrub plant, which belongs to the Lamiaceae family, stands out for the quality, quantity and chemical diversity of the essential oils. These oils have been used in the pharmaceutical, cosmetic and food industries. Some of the essential oil compounds have antibacterial, insecticidal and antioxidant properties with high demand on the international market of the fine perfumery industry. It is also popularly used in herbal medicine for treating several diseases, such as upper respiratory tract infection, fever, cough, diarrhea and pneumonia. Being a short-duration economically viable medicinal and aromatic crop, clove basil has huge potential for large scale cultivation. Plant genetic has an important role in determining the type and amount of secondary metabolites of medicinal plants. Moreover, the recognition of species and genotypes with high genetic capability in the production of desired metabolites has been at the top of the plant breeding plans of medicinal plants. In addition, essential oil composition of plants may be affected by harvest time which is due to the impact of weather conditions on plant growth and development. The present study was aimed to evaluate the oil composition of two genotypes in two harvests.

Materials and Methods: The research was conducted in the research farm of the college of agriculture, shahid Chamran University, Ahvaz, Iran during 2019. Two valuable genotypes of *Ocimum gratissimum* L. (278 and 296), with two different essential oil profiles, were investigated in two harvests; spring and autumn seasons. The aboveground parts of the plants were collected on June and November and dried on shade at room temperature. The essential oils of the plants were extracted by water distillation through Clevenger apparatus and the quantity and quality of the essential oils were analyzed by GC and GC-MS.

Results and Discussion: The results of present study showed that the essential oil content of two genotypes was not affected by the harvest season while its amount was different in two genotypes. The essential oil content of genotype 296 was 2-fold of 278. According to the qualitative analysis of the essential oils, fifty compounds were identified in the essential oils of 278 and 296 genotypes. More than 98% of the identified compounds (in the essential oils of these two genotypes) were classified into five chemical classes; including hydrocarbon and oxygenated monoterpens, and hydrocarbon and oxygenated sesquiterpene and phenylpropanoids. The major constituent of the essential oil of genotype 278 was oxygenated monoterpene, thymol, on June (35.48 %) and November (45.85 %), which was not found in genotype 296. Gamma-terpinene was also significantly increased from June (13.15 %) to November (25.80 %). P-cymene (11.31-3.56 %), alpha- thujone (4.76-2.94 %), Germacrene D (3.73-2.76 %), caryophyllene E (3.66-1.51 %), myrcene (2.93-3.01 %), alpha-terpinene (2.63-3.38 %) and bourneol (2.28-0.71 %) were the remains of oil composition. Dihydro eugenol, which belongs to the chemical class of phenylpropanoids, was identified as the main essential oil components of genotype 296 which its amount was not affected by the harvest time. The other oil constituents were Beta (Z)-Ocimene (11.89-3.40 %), Germacrene D (3.58-2.80 %), and caryophyllene E (0.52-2.68 %).

Conclusion: Terpenoids such as thymol are synthesized via the mevalonic acid pathway, and phenylpropanoid compounds such as dihydroeugenol and eugenol are synthesized via the shikimic acid pathway. The metabolite diversity across different species could be explained by the differential gene expression pattern. According to the results of the present study, thymol was identified as the main oil components of genotype 278.

1- Ph.D. Graduate, Department of Agronomy and Plant Breeding, Ilam University, Ilam, Iran
2- Associate Professor, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran and Associate Professor, Department of Biotechnology, Research Institute of Forests and Rangelands, AREEO, Tehran, Iran
(*- Corresponding Author Email: a.mehrabi@rifr-ac.ir)
3- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Shiraz University
4- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Shahid Chamran University of Ahvaz
5- Assistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Karaj, Iran
DOI: 10.22067/jhs.2021.61739.0

This may be due to the increased expression of mevalonate enzymes. The monoterpene was replaced by phenylpropanoid; dihydrogenugenol, in the oil of genotype 296 which might be due to more expression of the enzymes of the phenylpropanoid pathway. In the other hand, Thymol, P-cymene and gamma-terpinene in genotype 278 varied significantly in different harvesting times, indicating the effect of temperature on the activity of enzymes involved in the synthesis of essential oil components. On the contrary, the amount of dihydrogenugenol in genotype 278 on June and November is not affected by the environmental conditions in two seasons. With regard to the conclusions to the proper growth of genotype 278 and 296, as well several harvests annually, essential oil content and thymol and dihydrogenugenol, therefore, it is suggested that further research should be carried out for developing plant cultivation in Khuzestan and southern provinces which is not suitable for basil growth.

Keywords: Basil, Essential oil, Eugenol, Genotype, Thymol